

Relatório Final
Iniciação Científica I - F590



Estudo de superfícies de lignina e sua relação com a adesão bacteriana

Aluna: Mariana Zavarize Nica RA:094171

mariana.zavarizex(arroba)xhotmail.com

Orientadora: Prof. Mônica A. Cotta

<http://portal.ifi.unicamp.br/pessoas/corpo-docente/392-142>

1. Introdução

O objetivo deste trabalho é o estudo da superfície de um filme de lignina e sua possível correlação com a adesão da bactéria *Xylella fastidiosa*. O projeto visa a utilização do microscópio de força atômica, para a caracterização topográfica das amostras. Neste relatório serão apresentadas técnicas para quantificar a dimensão fractal de diferentes estruturas topográficas da amostra analisada.

O relatório será dividido da seguinte forma: na seção 2, serão discutidas a teoria dos fractais, detalhes da análise topográfica e do microscópio de força atômica (AFM), sobre a lignina e a bactéria *Xylella fastidiosa*. Na seção 3 será apresentado o procedimento experimental. A seção 4 consiste da apresentação e discussão dos dados coletados nas duas etapas do trabalho. A seção 5 contém a conclusão.

2.1 Teoria dos Fractais

Denomina-se objeto fractal o material que possui a mesma característica estrutural quando observado em diferentes escalas. Os objetos fractais são classificados em auto-similares ou auto-afins e em determinísticos ou estatísticos [1-5].

Um objeto é definido como auto-similar quando formado por partes que são similares ao todo, de modo que ele seja invariante sob transformações de escala isotrópicas. Por transformação de escala isotrópica entende-se uma dilatação que aumenta o tamanho do sistema uniformemente em todas as direções do espaço dimensional tratado. A ampliação de uma parte do objeto por um mesmo fator em todas as dimensões seria parecida a qualquer parte do original, com o mesmo tamanho da parte ampliada. Se a parte ampliada for idêntica à parte original, o objeto será um fractal auto-similar determinístico. Contudo, muitos objetos na natureza são aleatórios. E por causa desta aleatoriedade, tais objetos podem ser auto-similares somente num sentido estatístico. Um exemplo clássico é a linha costeira de um continente; dois mapas com diferentes magnificações representando uma linha costeira

típica se parecem, a ponto de não ser possível determinar qual deles tem a maior magnificação. Embora os dois mapas não se superponham, suas propriedades estatísticas são as mesmas. Objetos com essas propriedades são denominados fractais estatísticos.

Em contraste com os objetos auto-similares, as superfícies são geralmente fractais auto-afins: objetos invariantes sob transformações anisotrópicas. A superfície tem direções preferenciais, uma perpendicular à superfície e outra(s) ao longo dela. Portanto, há relações de escala distintas ao longo de diferentes direções. Como os fractais auto-similares, as superfícies auto-afins podem ser tanto determinísticas como estatísticas, apesar da maioria pertencer à última classe devidos à presença de processos estocásticos.

Dentro da teoria de Fractais, foi desenvolvida uma teoria de escala geral para a descrição dinâmica de superfícies [2,6,7]. O conceito de comportamento de escala ou lei de escala permite associar quantidades aparentemente distintas a expoentes que caracterizam a evolução da morfologia superficial. Esse expoente pode ser determinado a partir de leis de escala simples, que serão abordadas na próxima sessão.

2.2. Análise Topográfica

Para estudar a rugosidade superficial de um filme de lignina, é necessário determinar o expoente de rugosidade da superfície da amostra. Este coeficiente pode ser obtido através da equação da rugosidade média quadrática, sendo que a função rugosidade local é definida por $w(L, t) = \langle (h^2(\vec{x}, t) - \overline{h^2})^2 \rangle_{\vec{x}}^{\frac{1}{2}}$.

Onde $\langle h^2(\vec{x}, t) \rangle_{\vec{x}}$ é a altura média da superfície no instante t, e $\langle \dots \rangle_{\vec{x}}$ representa uma media em \vec{x} . A função rugosidade local mede o valor quadrático médio da altura $h(x,t)$ em função da dimensão lateral L da área considerada. A função $w(L, t)$ aumenta com o tempo de acordo com a relação $w(L, t) \sim t^\beta$ enquanto as correlações continuam a crescer. Porém, depois de um tempo limite τ , denominado tempo de saturação, o comprimento sobre o qual

as flutuações estão correlacionadas torna-se comparável ao comprimento L. Note que L é a máxima extensão que as correlações podem atingir ao longo da superfície. Para $t > \tau$, as correlações param de crescer e a superfície alcança um estado estacionário caracterizado por um valor constante de $w(L, t)$. No estado estacionário, a superfície é invariante sob a transformação de escala. A rugosidade de saturação comporta-se com L [1,2,5,6 e 11] como uma lei de potência $w_{sat} \equiv w(L, t \rightarrow \infty) \sim L^\alpha$, onde α é o expoente de rugosidade.

Neste trabalho, foi utilizada uma função diferente de w para a determinação de α ; a função utilizada aqui foi a função correlação de altura¹ [9], $H(R)$, que é definida por:

$$H(R) = \langle [h(x_2, y_2) - h(x_1, y_1)]^2 \rangle, \quad (1)$$

Onde $R = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$ e $\langle \dots \rangle$ representa a média em torno do plano X-Y.

Foram coletadas imagens de 256x256 pixels, com vários tamanhos LxL (com L sendo 2,5 μ m, 5 μ m, 7,5 μ m e 10 μ m).

Para determinar a dimensão fractal, é necessário levar em conta que a função correlação utilizada no tratamento das imagens não fornece imediatamente o expoente de rugosidade, sendo assim, é necessário descrever a função correlação $H(R)$ de outra maneira [8], portanto:

$$H(R) = 2w^2 \cdot \left(\frac{R}{\xi}\right)^{2\alpha} \quad \text{para } R \ll \xi, \quad (2),$$

$$H(R) = 2w^2 \quad \text{para } R \gg \xi. \quad (3),$$

Onde ξ é o comprimento de correlação, α é o expoente de rugosidade e w é a rugosidade média quadrática.

¹ A opção foi feita devido ao uso de ferramenta própria do software de distribuição livre Gwyddion (www.gwyddion.net), que foi utilizado no processamento de todas as imagens.

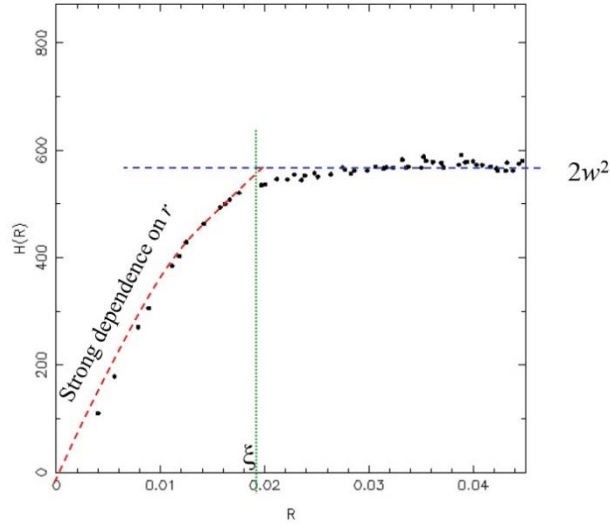


Figura 1. Gráfico ilustrativo da função correlação [12].

Na figura 1 é possível observar o comportamento da função $H(R)$. Quando R é menor que ξ , existe uma forte dependência com o valor de R , e quando R se torna maior que ξ a função satura e não se observam quase variações de H .

O comprimento de correlação ξ é a distância típica que em que as alturas estão correlacionadas, ou seja, durante a deposição do filme, ξ varia com R . Para um sistema finito, ξ não pode crescer indefinidamente, pois L limita seu tamanho, então quando ξ alcança o tamanho do sistema, toda a superfície se torna correlacionada, resultando na saturação da largura da interface.

Pelo gráfico da figura 1, vemos que é possível obter o expoente de rugosidade da superfície por regressão linear da curva na região onde $R \ll \xi$, ou seja, $\alpha = \frac{a}{2}$, onde a é o coeficiente angular obtido por regressão linear.

A dimensão fractal é calculada diretamente a partir de α ,

$$D_R = 3 - \alpha \quad [1]. \quad (4).$$

2.3. Microscópio de força atômica



Figura 2. Foto do microscópio de força atômica modelo Agilent 5500.

O microscópio de força atômica fornece imagens de uma superfície com resolução espacial nanométrica. Seu funcionamento se baseia na medida das deflexões de uma alavanca (de 100 a 200 μm de comprimento) em cuja extremidade livre está montada uma ponta de prova. Estas deflexões são causadas pelas forças de caráter eletrostático que agem entre a ponta e a superfície da amostra. Um outro elemento importante no microscópio é o scanner piezoelétrico, que permite a varredura em x-y da amostra, além de poder se movimentar na direção vertical. Existem vários tipos de medida para fazer imagens de vários tipos de amostras.

Os modos de obtenção das imagens de topografia (modos de varredura), referem-se basicamente a distância mantida entre a ponta de prova e a amostra.

Neste trabalho as medidas realizadas foram feitas no modo não contato. Quando operado nesse modo, a distância entre a ponta e superfície da amostra é da ordem de 10-100nm. Assim, a ponta trabalha no regime de forças atrativo, ou seja, para esta região a ponteira do AFM se enverga na direção da amostra.

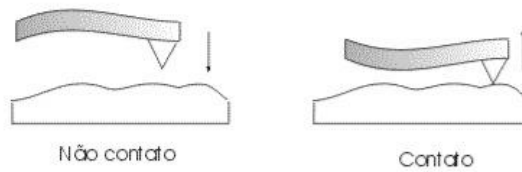


Figura 3. Representação do regime de força aplicado sobre a ponta de prova.

Na figura 3 é mostrada a deflexão da alavanca em ambos os modos. No modo de não-contato esta é atraída pelas forças a que está submetida e no modo contato a mesma sofre uma deflexão no sentido oposto (força repulsiva).

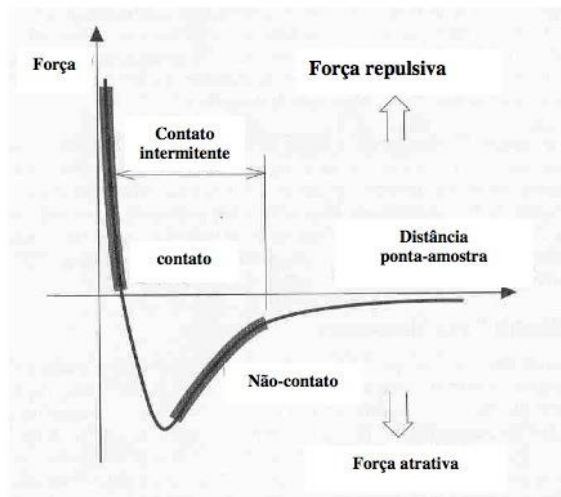


Figura 4a. Gráfico da força em função da distância da ponta a amostra.

Como no modo não-contato a ponta trabalha no regime de forças atrativo, um oscilador faz a alavanca vibrar com uma frequência f , com uma certa amplitude. Ao se aproximar da superfície, a interação entre ela e a ponta causam um amortecimento da amplitude de vibração.

A variação na amplitude é medida pelo detector, que, na frequência selecionada, envia o sinal ao sistema de realimentação do microscópio; então a nova frequência f' é menor que f_0 , e portanto a amplitude de vibração da alavanca diminui.

O sistema de realimentação trabalha para que se mantenha fixa uma certa diminuição dessa amplitude e assim a distância média entre a ponta de prova e a superfície da amostra

permanece constante, através do movimento em z do *scanner* piezoelétrico. O número de passos do *scanner* para compensar a variação de amplitude é usado para gerar a imagem topográfica.

2.4 Lignina e a bactéria *Xylella fastidiosa*

A lignina é comumente encontrada no xilema (por onde água e sais minerais circulam na planta) de plantas lenhosas (são capazes de produzir madeira para suporte dos caules) e é associada a celulose na parede celular gerando rigidez e impermeabilidade; sabe-se também que a lignina está relacionada a resistência da planta a ataques aos tecidos vegetais. Este trabalho visa abordar a influência deste material na adesão e propagação da bactéria em superfícies. A análise da taxa de contaminação da *Xylella fastidiosa*, mostra que em plantas não lenhosas (como a videira) a taxa de infecção, após a transmissão pelo vetor, é de 100% enquanto que para plantas lenhosas, essa taxa é bem menor, embora não esteja quantificada [13].

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria fitopatogênica limitada ao xilema, que tem afetado um grande número de plantas no Brasil e no mundo. Muitos trabalhos já foram realizados sobre esta bactéria, mas pouco se conhece a respeito da adesão, colonização e expressão dos sintomas.

O interesse de estudar a *Xylella fastidiosa* vem da sua importância econômica, ela também é conhecida como a praga do amarelinho que afeta laranjeiras e está entre os 10 fitopatógenos mais estudados no mundo [14].

O estudo destes sistemas são importantes para a compreensão do processo de formação dos biofilmes de forma mais geral, uma vez que infecções associadas a biofilmes de patógenos humanos são uma das principais causas de morte nos EUA [15].

3. Procedimento experimental

O trabalho pode ser dividido em duas etapas, aquisição das imagens e tratamento de imagens.

Para a aquisição das imagens, inicialmente foi necessário um treinamento para a utilização do microscópio de força atômica. Após a familiarização com o aparelho, utilizou-se uma amostra com um filme de lignina depositado sobre um substrato de silício para a obtenção das imagens.

O processo de preparação do microscópio requer muito cuidado, pois suas peças são muito sensíveis. Primeiro é necessário colocar a ponta de silício em uma peça chamada "One Piece Nose-Assembly", essa peça é encaixada no scanner como mostra a figura 5.



Figura 5. Fotos dos componentes do AFM Agilent 5500 [10].

Após o *scanner* ser encaixado no equipamento, é necessário alinhar o laser na ponta de prova, e em seguida inserir o detector e alinhar o mesmo.

A última etapa é colocar a amostra em um suporte e encaixar o mesmo no microscópio com muito cuidado para que a amostra não se choque com a ponta. Feito isso é necessário achar a frequência de ressonância da alavanca com o software PicoView e então fazer a aproximação da ponta com a amostra e realizar as medidas.

Após a coleta, o tratamento das imagens foi feito com o auxílio do software Gwyddion. As imagens foram filtradas utilizando: "Correct horizontal scars" e "Correct lines by matching Height Median" - esses filtros corrigem falhas que surgem durante as medidas.

Em seguida, utilizando a sessão “Calculate 1D statistical functions” obteve-se a função correlação de altura utilizada na análise dos dados (Height height correlation function) e os dados foram plotados no software Origin®.

Com o software Origin®, plotamos gráficos log-log da função correlação de altura e a regressão linear da curva foi feita na região da origem até sua saturação.

Durante o trabalho duas amostras foram utilizadas, a primeira contém apenas o filme de lignina. A amostra foi produzida pela técnica de spray pelo professor Carlos José Constantino, da UNESP de São José do Rio Preto.

A segunda amostra foi produzida a partir do filme e sobre ela foi depositada uma solução com as bactérias *Xylella fastidiosa*. Após um período de crescimento bacteriano de 1 dia então a amostra passou por um processo de secagem.

4. Resultados

4.1. Estudo da Superfície de Lignina

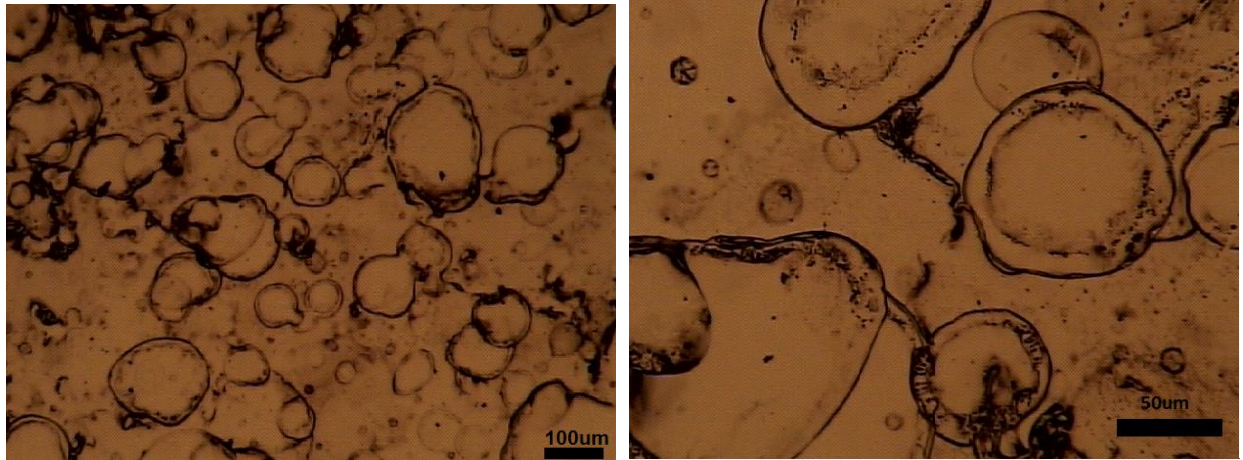


Figura 6. Imagem da superfície do filme de lignina obtida com resolução 5X e 20X no microscópio óptico.

As figuras de 7 a 11, mostram 5 regiões diferentes da amostra analisada, para cada região foram coletadas 4 imagens, todas com centro na mesma origem, mas com tamanhos diferentes.

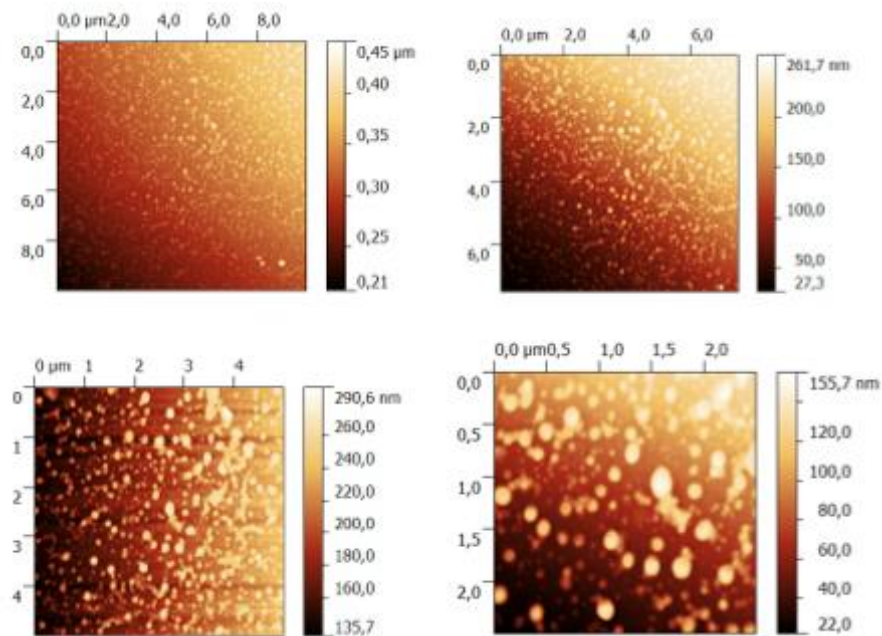


Figura 7. Imagens topográficas da região 1 da amostra, para os tamanhos 2,5µm, 5 µm, 7,5 µm e 10 µm.

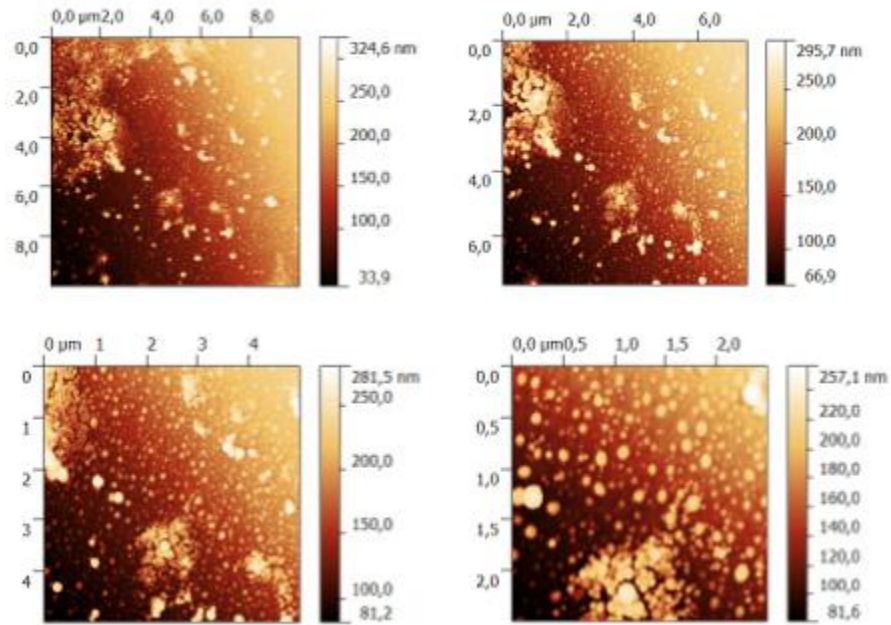


Figura 8. Imagens topográficas da região 2 da amostra, para os tamanhos 2,5μm, 5 μm, 7,5 μm e 10 μm.

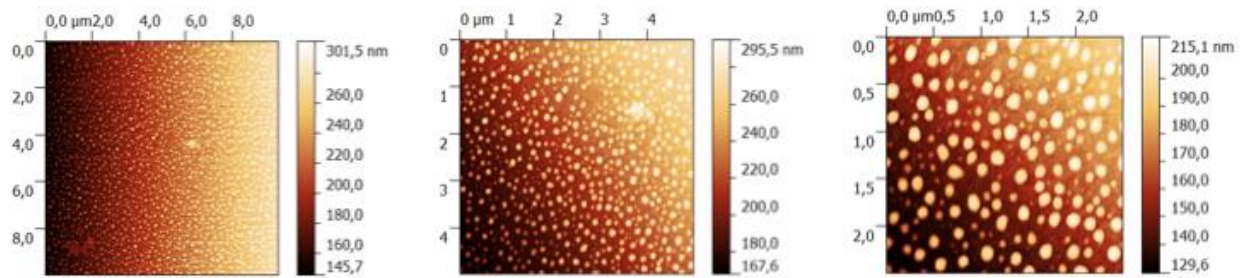


Figura 9. Imagens topográficas da região 3 da amostra, para os tamanhos 2,5μm, 5 μm e 10 μm.

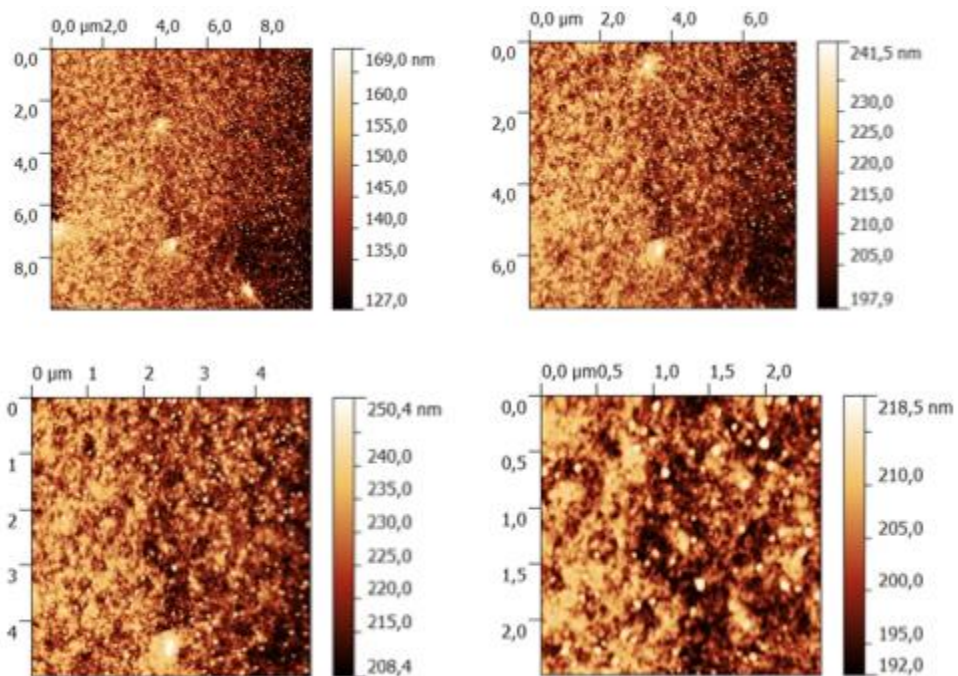


Figura 10. Imagens topográficas da região 4 da amostra, para os tamanhos 2,5 μm , 5 μm , 7,5 μm e 10 μm .

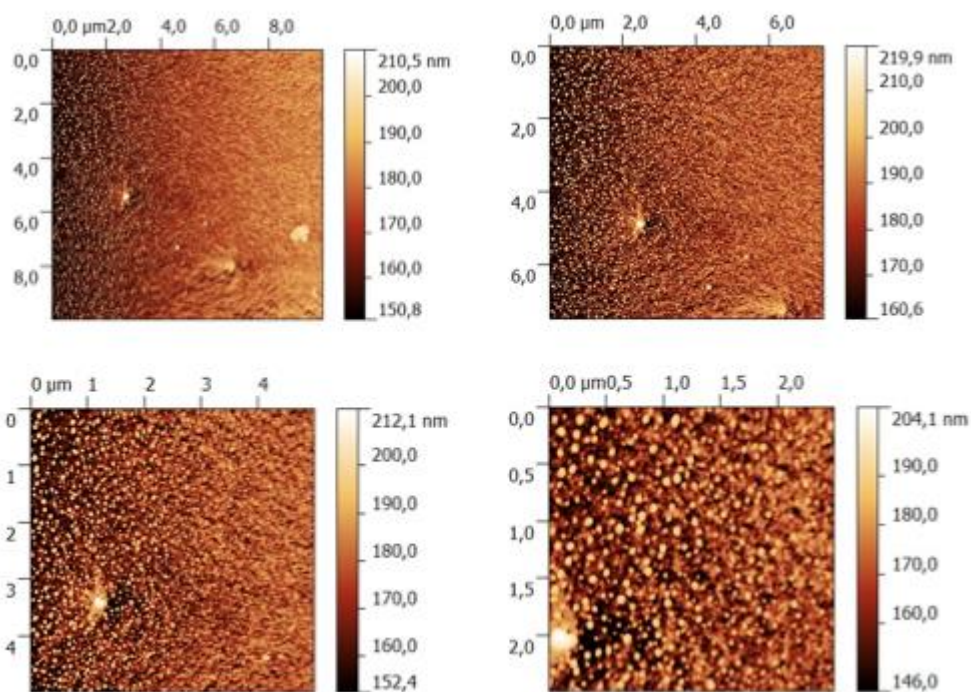


Figura 11. Imagens topográficas da região 5 da amostra, para os tamanhos 2,5 μm , 5 μm , 7,5 μm e 10 μm .

Ao observar as imagens da superfície de lignina, primeiramente a figura 6, obtida através do microscópio óptico, observa-se que a superfície é irregular e cheia de bolhas. Essas bolhas são devidas a técnica utilizada para a deposição do filme no substrato (técnica de spray).

As imagens de topografia do AFM foram feitas nas regiões mais planas da amostra, ou seja, dentro das bolhas. Observamos que o filme de lignina apresenta estruturas semi-esféricas de diferentes tamanhos por todo o substrato, e nas regiões das bordas presentes na figura 6, observa-se uma camada mais espessa do material, em torno de $\Delta H_{Superfície} = 157,9nm$.

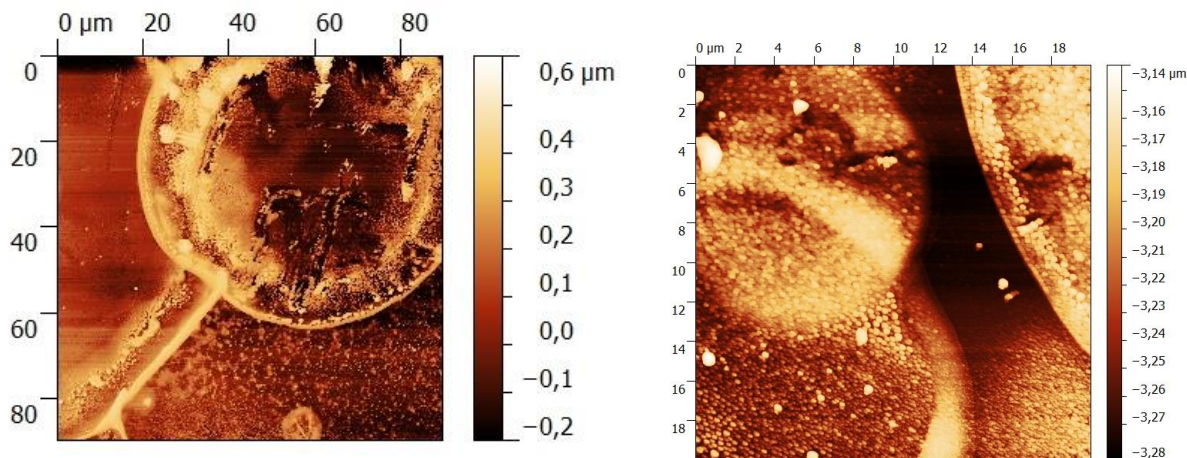


Figura 12: Imagens topográficas da superfície de lignina.

Nas imagens da figura 12, de maior área, é possível observar com bastante clareza a irregularidade do filme. Dentro das bolhas a superfície geralmente é plana (sem aglomerados da solução seca de lignina), enquanto que nas bordas há uma evidente superposição de camadas do material. Ainda na imagem da esquerda da figura 12, é possível observar um desprendimento do filme na região interna da bolha, o que revela que ele não tem boa aderência ao substrato.

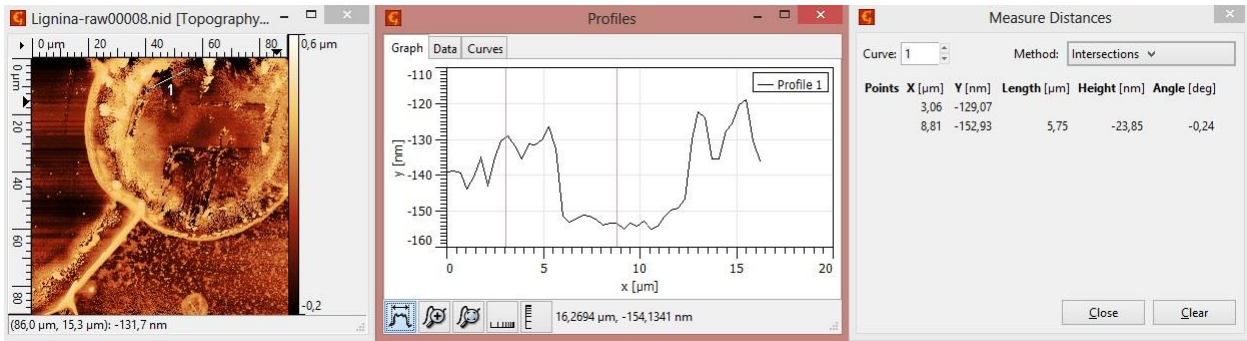


Figura 13: Medida da espessura do filme.

Com o desprendimento do filme foi possível calcular a sua espessura, como mostra a figura 13, com o auxílio do software Gwyddion, a espessura obtida foi de $z \sim 240 \text{ \AA}$.

A partir das imagens de 7 a 11, os gráficos abaixo foram plotados, assim como as tabelas com os valores referentes a regressão linear das curvas.

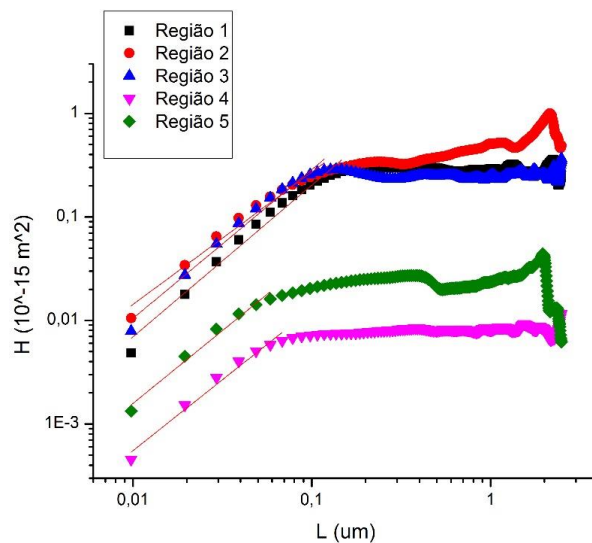


Gráfico 1: Função correlação de altura em função do comprimento para imagens de $2,5 \mu\text{m}$.

Tabela 1. Coeficientes da regressão linear das curvas do gráfico 1.

Equation	y = a + b*x			Equation	y = a + b*x		
Weight	No Weighting			Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0,07259			Residual Sum of Squares	0,03428		
Pearson's r	0,98963			Pearson's r	0,98486		
Adj. R-Square	0,97778			Adj. R-Square	0,96494		
		Value	Standard Error			Value	Standard Error
Região 1	Intercept	-5,43933	0,42517	Região 4	Intercept	-7,82533	0,69576
	Slope	1,4649	0,05897		Slope	1,3014	0,09352
Equation	y = a + b*x			Equation	y = a + b*x		
Weight	No Weighting			Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0,07316			Residual Sum of Squares	0,01601		
Pearson's r	0,96361			Pearson's r	0,99035		
Adj. R-Square	0,96479			Adj. R-Square	0,97568		
		Value	Standard Error			Value	Standard Error
Região 2	Intercept	-7,077	0,48613	Região 5	Intercept	-8,56127	0,74127
	Slope	1,21743	0,06442		Slope	1,40505	0,09833
Equation	y = a + b*x						
Weight	No Weighting						
Residual Sum of Squares	0,04718						
Pearson's r	0,99052						
Adj. R-Square	0,97924						
		Value	Standard Error				
Região 3	Intercept	-5,47219	0,46017				
	Slope	1,43856	0,06309				

O gráfico 1 representa a curva de correlação de altura para imagens de 2,5 µm.

Na tabela 1, é possível observar que todos os valores do coeficiente angular são muito próximos, de (2) temos que o expoente de rugosidade varia de 0,61 a 0,73.

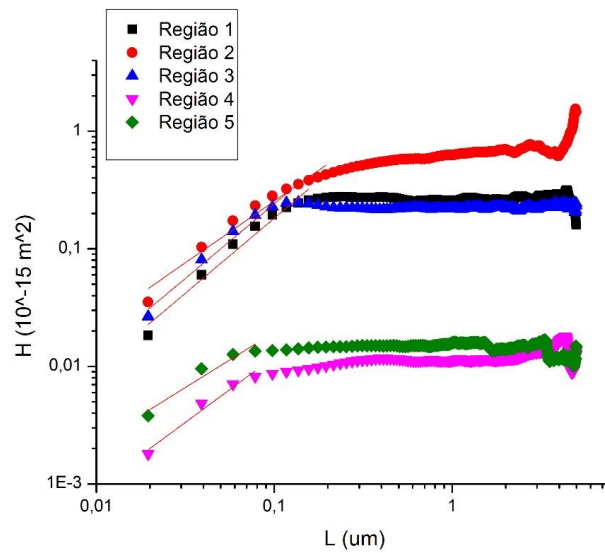


Gráfico 2: Função correlação em função do comprimento para imagens de 5 µm.

Tabela 2. Coeficientes da regressão linear das curvas do gráfico 2.

Equation	$y = a + b \cdot x$		
Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0,03288		
Pearson's r	0,98499		
Adj. R-Square	0,96524		
		Value	Standard Error
Região 1	Intercept	-8,80522	0,6519
	Slope	1,2764	0,09131
Equation	$y = a + b \cdot x$		
Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0,03916		
Pearson's r	0,98107		
Adj. R-Square	0,9578		
		Value	Standard Error
Região 2	Intercept	-8,24748	0,51715
	Slope	1,04954	0,07325
Equation	$y = a + b \cdot x$		
Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0,01701		
Pearson's r	0,98744		
Adj. R-Square	0,9688		
		Value	Standard Error
Região 3	Intercept	-6,75081	0,73349
	Slope	1,26685	0,10134
Equation	$y = a + b \cdot x$		
Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0,0079		
Pearson's r	0,98487		
Adj. R-Square	0,95496		
		Value	Standard Error
Região 4	Intercept	-9,09682	1,02417
	Slope	1,11736	0,13901
Equation	$y = a + b \cdot x$		
Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0,01179		
Pearson's r	0,96892		
Adj. R-Square	0,90822		
		Value	Standard Error
Região 5	Intercept	-10,12684	1,25078
	Slope	0,94044	0,16976

Como no gráfico anterior, este também apresenta os expoentes de rugosidade com valores muito próximos, variando de 0,47 a 0,64.

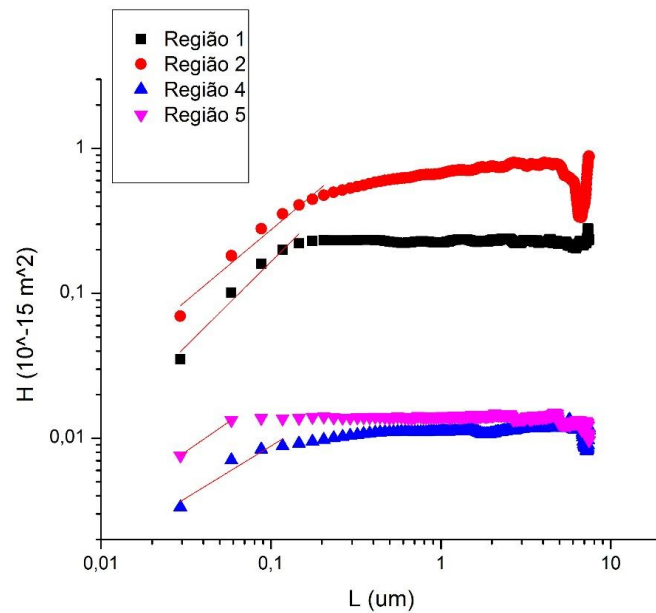


Gráfico 3: Função correlação em função do comprimento para imagens de 7,5 μm .

Tabela 3. Coeficientes da regressão linear das curvas do gráfico 3.

Equation	y= a + b*x		
Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0,02494		
Pearson's r	0,97433		
Adj. R-Square	0,93664		
		Value	Standard Error
Região 1	Intercept	-8,37787	0,86653
	Slope	1,06205	0,12271
Equation	y= a + b*x		
Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0,00701		
Pearson's r	0,99076		
Adj. R-Square	0,97548		
		Value	Standard Error
Região 2	Intercept	-7,7695	0,82385
	Slope	1,10847	0,0876
Equation	y= a + b*x		
Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0,00338		
Pearson's r	0,9809		
Adj. R-Square	0,92434		
		Value	Standard Error
Região 4	Intercept	-10,98888	1,23893
	Slope	0,85872	0,17027
Equation	y= a + b*x		
Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0		
Pearson's r	--		
Adj. R-Square	--		
		Value	Standard Error
Região 5	Intercept	-11,01136	--
	Slope	0,81078	--

O Gráfico 3 apresenta expoentes de rugosidade variando de 0,41 a 0,53.

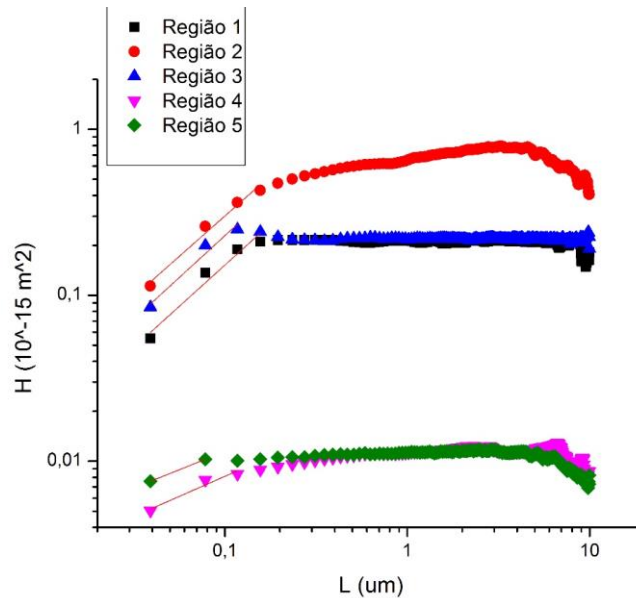


Gráfico 4: Função correlação em função do comprimento para imagens de 10 μm .

Tabela 4. Coeficientes da regressão linear das curvas do gráfico 4.

Equation	$y = a + b \cdot x$			Equation	$y = a + b \cdot x$		
Weight	No Weighting			Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0,00367			Residual Sum of Squares	0		
Pearson's r	0,99068			Pearson's r	--		
Adj. R-Square	0,9721			Adj. R-Square	--		
		Value	Standard Error			Value	Standard Error
Região 2	Intercept	-8,71479	0,86897	Região 4	Intercept	-13,85129	--
	Slope	0,97252	0,09486		Slope	0,44138	--
Equation	$y = a + b \cdot x$			Equation	$y = a + b \cdot x$		
Weight	No Weighting			Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0,00374			Residual Sum of Squares	0,0013		
Pearson's r	0,98488			Pearson's r	0,97699		
Adj. R-Square	0,9387			Adj. R-Square	0,909		
		Value	Standard Error			Value	Standard Error
Região 3	Intercept	-8,5885	1,28128	Região 5	Intercept	-13,7095	0,75429
	Slope	1,00753	0,17916		Slope	0,48309	0,10547
Equation	$y = a + b \cdot x$						
Weight	No Weighting						
Residual Sum of Squares	0,00817						
Pearson's r	0,98038						
Adj. R-Square	0,9417						
		Value	Standard Error				
Região 1	Intercept	-8,88065	0,89875				
	Slope	0,99396	0,14133				

O gráfico 4 apresenta expoentes de rugosidade variando de 0,49 a 0,50.

Nos gráficos 3 e 4, para imagens de tamanho $L=7,5 \mu\text{m}$ e $L=10 \mu\text{m}$, os expoentes de rugosidade e dimensão fractal começam a aumentar em relação aos dois primeiros.

Tabela 5. Valores das distâncias entre cada ponto medido para cada valor de L .

Tamanho (L)	Distancia entre pontos medidos (m)
2,5 μm	$9,8 \cdot 10^{-9}$
5,0 μm	$1,6 \cdot 10^{-8}$
7,5 μm	$2,9 \cdot 10^{-8}$
10,0 μm	$3,9 \cdot 10^{-8}$

A tabela 5 mostra que conforme o tamanho da imagem aumenta, a distância entre cada ponto medido também aumenta; isso gera uma grande perda de informações durante a medida, por essa razão não é possível analisar as imagens de 10 μm e 7,5 μm com a mesma precisão das imagens de 2,5 μm .

Tabela 6. Dados do tamanho das amostras (μm), Coeficientes angulares e lineares (Slope e Intercept), Expoente de rugosidade (α), Dimensão fractal (D_R) e Comprimento de correlação (μm).

	L(μm)	Slope	σ_{Slope}	Intercept	$\sigma_{Intercept}$	α	σ_α	D_R	σ_{D_R}	ξ (μm)	σ_ξ
Região 1	2,5	1,46	0,06	-5,44	0,43	0,73	0,03	2,27	0,03	0,17	0,01
Região 2	2,5	1,22	0,06	-7,08	0,47	0,61	0,03	2,39	0,03	0,19	0,01
Região 3	2,5	1,44	0,06	-5,47	0,46	0,72	0,03	2,28	0,03	0,15	0,01
Região 4	2,5	1,30	0,09	-7,83	0,70	0,65	0,05	2,35	0,05	0,11	0,01
Região 5	2,5	1,41	0,10	-6,56	0,74	0,70	0,05	2,30	0,05	0,18	0,01
Região 1	5	1,28	0,09	-6,81	0,65	0,64	0,05	2,36	0,05	0,18	0,01
Região 2	5	1,05	0,07	-8,25	0,52	0,52	0,04	2,48	0,04	0,20	0,01
Região 3	5	1,27	0,10	-6,75	0,73	0,63	0,05	2,37	0,05	0,16	0,01
Região 4	5	1,12	0,14	-9,10	1,02	0,56	0,07	2,44	0,07	0,20	0,01
Região 5	5	0,94	0,17	-10,13	1,25	0,47	0,08	2,53	0,08	0,14	0,01
Região 1	7,5	1,06	0,12	-8,38	0,87	0,53	0,06	2,47	0,06	0,21	0,01
Região 2	7,5	1,11	0,09	-10,99	1,24	0,55	0,04	2,45	0,04	0,26	0,01
Região 3	7,5	0,81	-	-11,01	-	0,41	-	2,59	-	0,23	0,01
Região 1	10	0,97	0,09	-8,71	0,67	0,49	0,05	2,51	0,05	0,14	0,01
Região 2	10	1,01	0,18	-8,59	1,21	0,50	0,09	2,50	0,09	0,20	0,01
Região 3	10	0,99	0,14	-8,86	1,00	0,50	0,07	2,50	0,07	0,15	0,01

Apesar do aumento desses coeficientes das curvas dos gráficos 3 e 4, os valores continuam sendo próximos, e considerando a perda de informação durante a medida, ainda se observa um comportamento fractal estatístico da superfície do filme.

Dos gráficos 1 a 4, ainda nota-se que para as regiões 4 e 5 as curvas apresentam a região de crescimento (região onde $r < \xi$) menor que as regiões 1, 2 e 3. Isso ocorre porque as regiões 4 e 5, apresentam uma menor deposição das estruturas semi-esféricas de lignina (isso é visível nas imagens 10 e 11). Por isso os valores dos expoentes de rugosidade são maiores para essas regiões, já que para essas superfícies locais a diferença entre as alturas é maior. Portanto, apesar da superfície ser irregular, observa-se um comportamento fractal estatístico através do expoente de rugosidade. A tabela 6 mostra que, para as imagens variando de 10 μm a 2,5 μm , temos que $\alpha \sim 0,58$ e $D_R \sim 2,42$.

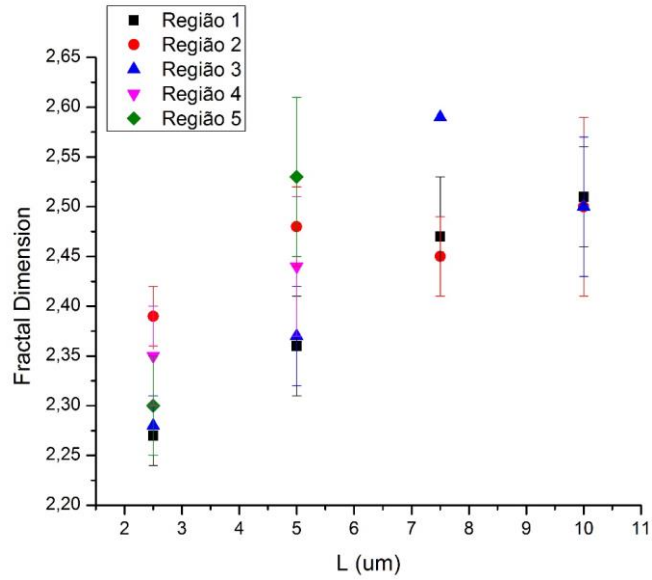


Gráfico 5: Dimensão fractal em função do tamanho da imagem.

O gráfico 5 fornece informações sobre a dimensão fractal das imagens; de (4) tem-se que D_R varia de 2,27 a 2,59, e é menor para imagens com menor tamanho de L. Como pode ser observado nas imagens de topografia acima, as de $L=2,5\mu\text{m}$ são mais uniformes entre si, isso faz com que no cálculo da função correlação de altura (1), a diferença de altura seja menor e com isso o expoente de rugosidade “ 2α ” de (2), também diminui; conseqüentemente D_R irá apresentar valores menores nesse caso.

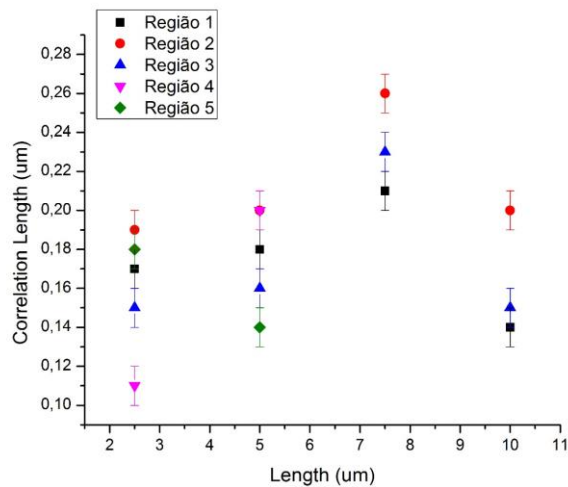


Gráfico 6: Comprimento de correlação em função do tamanho da imagem.

O gráfico 6 apresenta o comprimento de correlação das imagens em função de L , ξ varia de 0,11 a 0,26. É observado que conforme o tamanho das imagens diminui, ξ também diminui, o que é consistente com o que foi observado até o momento.

4.2. Superfície de lignina com as bactérias *Xylophaga fastidiosa*

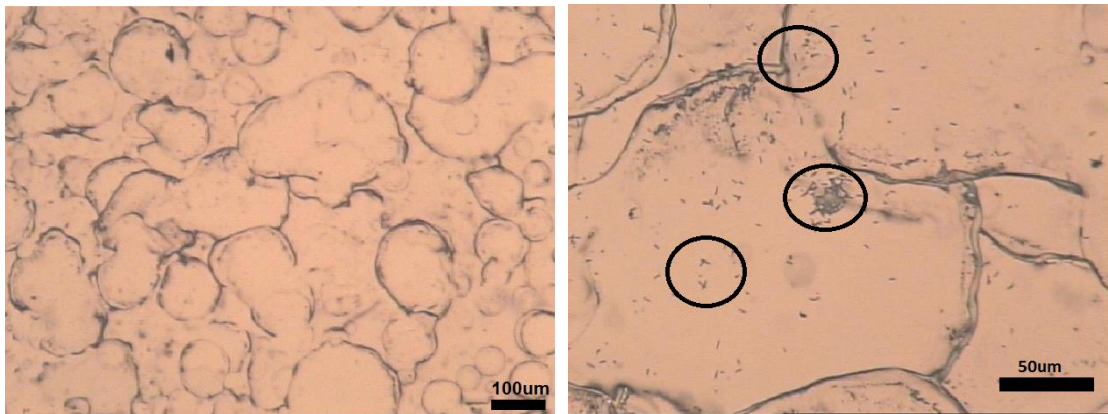


Figura 14: Imagens da superfície do filme de lignina com bactéria obtidas com resoluções de 5X e 20X no microscópio óptico.

As imagens da figura 14, foram obtidas com um microscópio óptico. Nela é possível ver novamente a superfície irregular da lignina e na imagem de 20X ainda é possível observar a dispersão das bactérias no filme.

A imagem mostra que elas se concentram no meio das bolhas e próximas as bordas, como está destacado na figura 14.

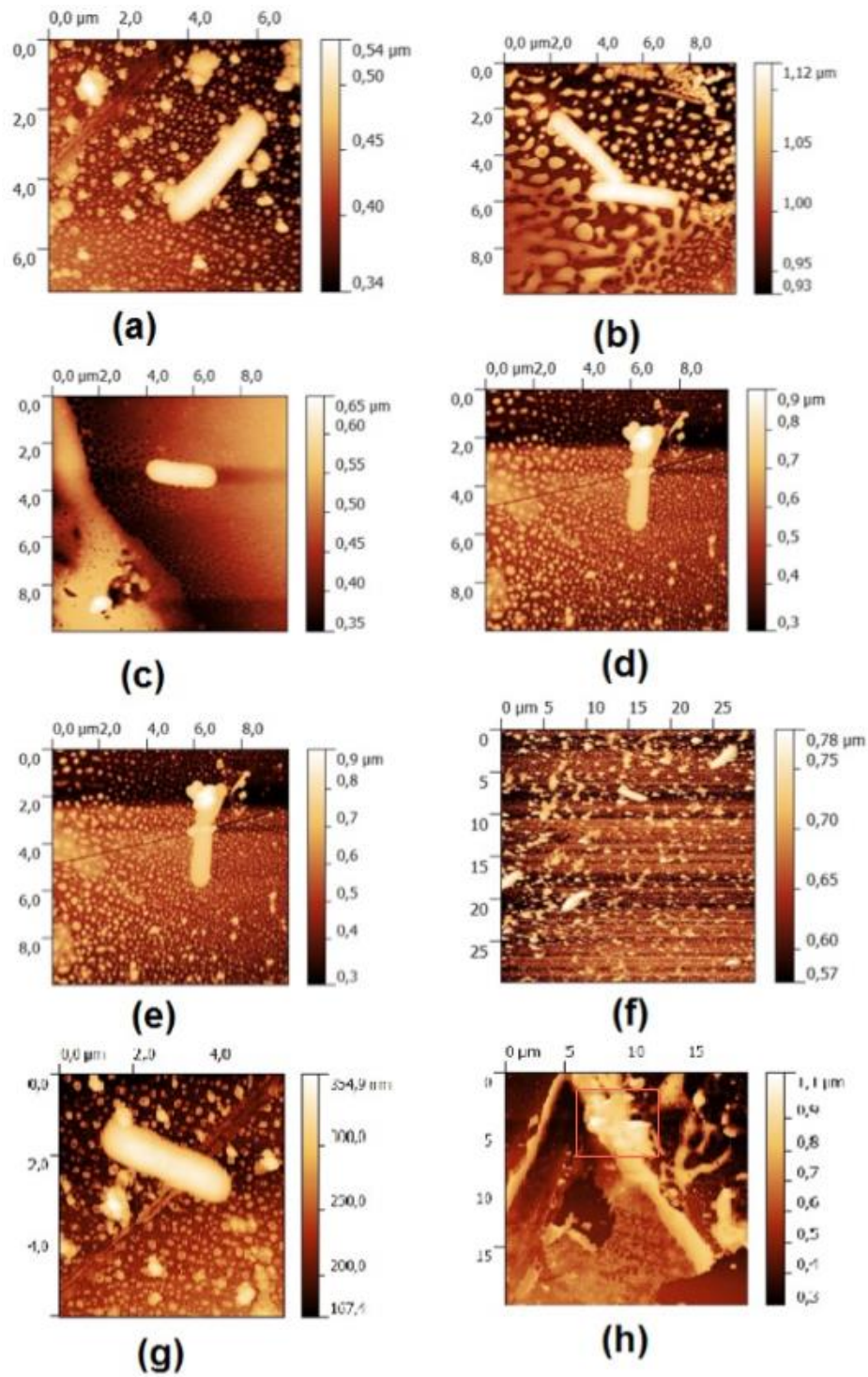


Figura 15. Imagens de topografia da superfície do filme de lignina com bactéria.

Na imagem da figura 15 no lugar das estruturas de lignina aparece um material diferente, que ficou distorcido na imagem. Este material provavelmente é um resíduo da solução em que a bactéria foi preparada e secou sobre o filme. Assim aparecem como grão maiores presentes nas imagens.

Em 15.(h) é possível observar outro desdobramento do filme, que foi medido como mostra a figura abaixo.

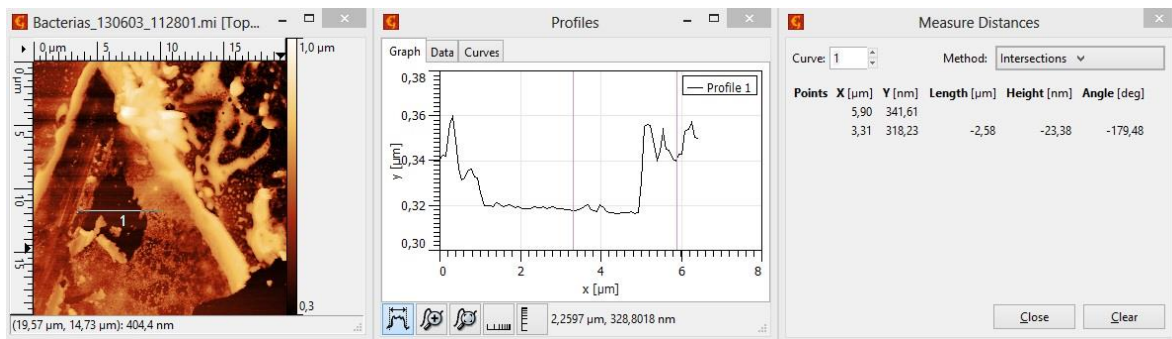


Figura 16. Medida da espessura do filme.

O valor da espessura do filme obtido foi $L \sim 240 \text{ \AA}$, o mesmo valor da medida anterior (figura 13).

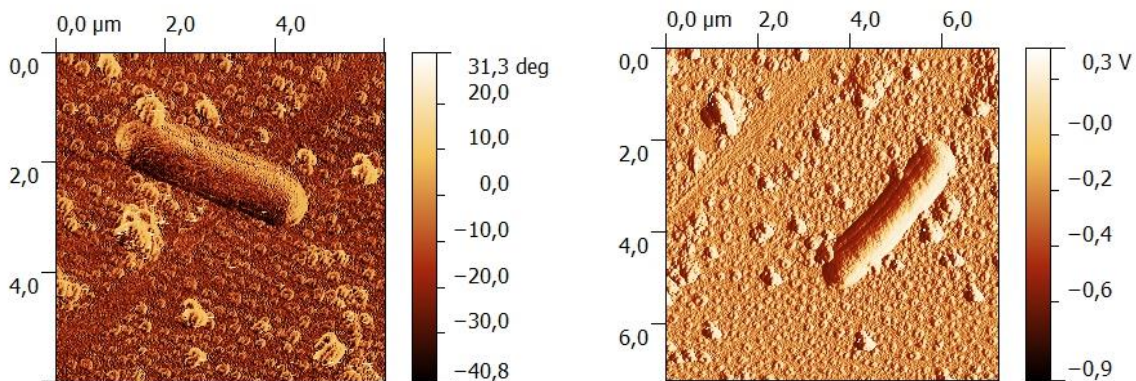


Figura 17: Imagens de fase referente as figuras 15.(g) e 15.(a).

Na figura 17, estão representadas duas imagens de fase, a imagem de fase é utilizada para diferenciar materiais, com diferentes propriedades mecânicas na superfície da amostra [17]. Ao observar a imagem é possível notar que existe uma borda mais clara em torno das bactérias, que indica a presença de um polímero extracelular, o EPS [16], produzido pela bactéria ao sofrer uma adesão irreversível no filme. Não seria possível observar o EPS no microscópio óptico, pois ele não tem resolução suficiente.

Ainda em 15.(h), de crescimento bacteriano, nota-se dentro da região em destaque, que as bactérias estão aglomeradas sobre uma camada mais grossa de material, porém com os dados obtidos não é possível identificá-lo. Este material pode ser tanto lignina como resto da solução que a bactéria foi preparada. Não foi possível fazer mais imagens das bactérias nas bordas, pois a altura nessas regiões é muito alta e a medida AFM torna-se mais difícil, porém essa imagem indica que a topografia na escala analisada não afeta adesão da bactéria no filme de lignina.

5. Conclusão

Na primeira parte do trabalho, o filme de lignina foi estudado, o objetivo era explorar seu comportamento fractal de superfícies auto-afins, foi calculado que para imagens de comprimento de $2,5\mu\text{m}$ a dimensão fractal da superfície variou de 2,27 a 2,39, para as imagens de comprimento de $5\mu\text{m}$ a variação foi de 2,43 a 2,53, para comprimentos de $7,5\mu\text{m}$ a variação foi de 2,47 a 2,59 e para imagens de $10\mu\text{m}$ a variação foi de 2,50 a 2,51.

O aumento do valor de D_R se deve a maior irregularidade na superfície conforme o tamanho da imagem aumenta. Ainda é necessário considerar que as imagens de $10\mu\text{m}$ e $7,5\mu\text{m}$ possuem menos informação que as de $5\mu\text{m}$ e $2,5\mu\text{m}$.

Apesar dessas diferenças o filme apresenta um comportamento fractal estatístico, uma vez que os valores de D_R ainda são muito próximos entre si. Portanto, independente do tamanho e forma das estruturas de lignina ou de sua dispersão local, toda a superfície possui o mesmo expoente de rugosidade.

Na segunda parte, quanto ao estudo da adesão das bactérias não se observou indícios de que a topografia do filme na escala analisada interfere em sua aderência. Pois, apesar de normalmente as bactérias se fixarem em superfícies planas, elas também foram encontradas sobre grossas camadas de algum material não identificado (lignina ou resíduos da solução em que ela foi preparada); com os dados coletados não é possível fazer essa identificação.

6. Referências

- [1] A.-L.Barabási and H.E.Stanley, *Fractal concepts in surface growth* (Cambridge University Press, Cambridge UK, 1995)
- [2] F.Family and T.Vicsek, eds, *Dynamics of Fractal Surfaces* (World Scientific, Singapore, 1991)
- [3] B.B. Mandelbrot, *The Fractal Geometry of Nature* (Freeman, San Francisco, 1982)
- [4] J. Feder, *Fractals* (Plenum Press, New York, 1988)
- [5] T. Vicsek, *Kinetic Growth Phenomena*, 2nd Edition (World Scientific, Singapore, 1992)
- [6] F.Family, "Rough surfaces: scaling theory and universality", in *Universalities in Condensed Matter Physics*, edited by R.Jullien, L. Pelliti, R.R. and N. Boccaro (Springer- Verlag, Berlin, 1998)
- [7] F.Family and T.Vicsek, "Scaling of the active zone in the Eden process on percolation networks and ballistic model", *J. Phys. A* 18, L75 (1985)
- [8] Y.Park and S.Rhee, "Growth and fractal scaling nature of copper thin films on TiN surface by metal organic chemical vapor deposition from hexafluoroacetylacetonate Cu(I) vinyltrimethylsilane", *American Vacuum Society*, 1997.
- [9] *Gwyddion user guide*.
- [10] *Agilent 5500 SPM User's Guide - Characterization Facility*.
- [11] F. Family, "Dynamic scaling and phase transitions in interface growth", *Physica A* 168, 561 (1990)

[12] Max Bloomfield, "Concepts of Roughness", june, 2006.

[13] Alessandra A.de Souza, Comunicação particular (2013).

[14] J. Mansfield, S.Genin, S.Magori, V.Citovsky, M.Sriariyanum, P.Ronald, M.Dow, V.Verdier,S.V.Beer, M.A.Machado, G.Salmond, G.D.Foster, Molecular Plant Pathology (2012), DOI:10.1111/J.1364-3703.2012.00804.X

[15] <http://www.hhs.gov/ash/initiatives/hai/index.html>, acessado em 29/06/2012

[16] GS Lorite, A.A. Souza, M.A. Cotta, "On the role of extracellular polymeric substances during early stages of Xylella fastidiosa biofilm formation.", 2013

[17] S.N. Magonov^a, V. Elings^a, M.-H. Whangbo, "Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy", 1997

Opinião da Orientadora

Apesar de não termos encontrado correlação entre as características superficiais da lignina com a adesão bacteriana, e de o projeto ter sofrido atraso pois nosso microscópio ficou mais de um mês em manutenção (e o do LAMULT também estar com problemas de ruído na sala), Mariana se saiu muito bem. Ela mostrou muita iniciativa no estudo de teoria de análise fractal e no contato com o equipamento. Considero excelente seu trabalho, que deverá continuar com maior profundidade no próximo semestre.